

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IT05/000048

International filing date: 02 February 2005 (02.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: MI2004A000167
Filing date: 04 February 2004 (04.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 May 2005 (17.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

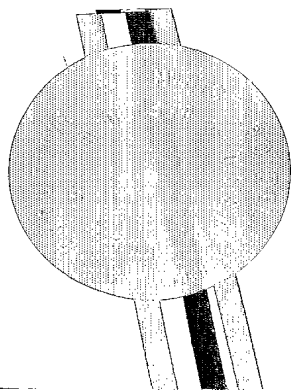
Ufficio G2.



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000167**

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li..... **20 APR. 2005**



IL FUNZIONARIO

..... *Giampietro Carlotto*
Giampietro Carlotto

4355PTIT

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

MI 2004 A 0 0 0 1 6 7

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 00742430283
INDIRIZZO COMPLETO	A4	PADOVA		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
A. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITA'/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	Metodo per l'estrazione simultanea di acidi nucleici da un campione biologico		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	CALABRESE FIORELLA
NAZIONALITA'	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	



E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2 C12Q	E3 1/68	E4	E5

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1				
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	DR. DIEGO PALLINI				

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	II	N. 484 DR. DIEGO PALLINI
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.
INDIRIZZO	I3	C.SO DI PORTA VITTORIA 9
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	20122 MILANO
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 1 ESEMPLARI)	1		42
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 1 ESEMPLARI)	1		4
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	0		
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO	0		
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	0		

LETTERA D'INCARICO

PROCURA GENERALE

RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE

(SI/NO)

SI

NO

NO

(LIRE/EURO)

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO

FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI
PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI)
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA
AUTENTICA? (SI/NO)

SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ
AL PUBBLICO? (SI/NO)

DATA DI COMPILAZIONE

FIRMA DEL/DEI

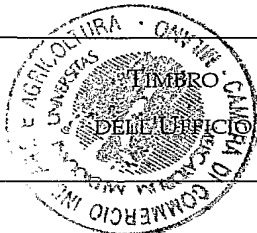
RICHIEDENTE/I

4 FEBBRAIO 2004

DR. DIEGO PALLINI

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	MI 2004 A 000167		
C.C.I.A.A. DI	MILANO		COD. 15
IN DATA	4 FEBBRAIO 2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME	
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.	00	FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE		



CORTONESI MAURIZIO

4355PTIT

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA: **MI 2004 A 0 0 0 1 6 7**DATA DI DEPOSITO: **4 FEBBRAIO 2004****A. RICHIEDENTE/I** COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**
PADOVA**C. TITOLO****Metodo per l'estrazione simultanea di acidi nucleici da un campione biologico**

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

L. CLASSE PROPOSTA**C12Q****1/68****O. RIASSUNTO**

L'invenzione riguarda un procedimento per isolare contemporaneamente e separatamente gli acidi ribonucleici e gli acidi deossiribonucleici da uno stesso campione biologico, comprendente essenzialmente i seguenti passaggi:

- a) lisi del campione mediante incubazione in una soluzione di lisi comprendente: un agente caotropico, un detergente ionico, un enzima proteolitico, un agente riducente
- b) deproteinizzazione
- c) precipitazione separata degli acidi ribonucleici (RNA) e DNA rispettivamente dalla fase acquosa e dalla fase organica.

L'invenzione comprende inoltre kit per realizzare il metodo dell'invenzione.

P. DISEGNO PRINCIPALE**FIRMA DEL/DEI**
RICHIEDENTE/I**DR. DIEGO PALLINI**

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'D. Pallini', written over the printed name.

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Metodo per l'estrazione simultanea di acidi nucleici da un campione biologico"

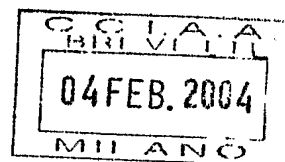
a nome di : UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

con sede in : PADOVA

Inventori designati : CALABRESE Fiorella

depositata il

con n.



CAMPO DELL'INVENZIONE

Il campo dell'invenzione riguarda un metodo biochimico per l'estrazione di acidi nucleici da campioni biologici.

MI 2004 A 0 0 0 1 6 Z

TECNICA ANTERIORE

La moderna biologia molecolare ha rivoluzionato la biologia e i diversi rami delle scienze biomediche. Il connubio tra la scienza biomedica e la clinica ha assunto attraverso gli anni sempre più un aspetto pratico ed immediato. Recentemente l'applicazione delle tecniche del DNA ricombinante hanno avuto una straordinaria diffusione nei diversi campi della diagnostica, consentendo di fornire una diagnosi più rapida ed accurata. L'identificazione e la quantificazione di diversi agenti infettivi (con genoma ad RNA o DNA), la dimostrazione della iperespressione di oncogeni (marker prognostici di diverse neoplasie), la caratterizzazione di numerose malattie genetiche (rilevazione di mutazioni e delezioni di diversi geni) e il riconoscimento della reale monoclonalità di una popolazione linfoide (analisi del riarrangiamento genico) sono solo alcune delle più comuni diagnosi fornite dai laboratori di biologia

molecolare.

Le tecniche a disposizione, oggi, consentono di estrarre DNA o RNA da cellule e/o tessuti di varia origine. A tal proposito sono conosciuti diversi protocolli, proposti anche in commercio sotto forma di "kits", che consentono l'estrazione del DNA o del RNA da diverso tipo di materiale (fluidi biologici, colture cellulari e tessuti per lo più freschi o congelati).

La quantità oltre che la qualità degli acidi nucleici estratti è spesso un attributo cruciale per la riuscita delle indagini molecolari non in situ come ad esempio la PCR (Polymerase Chain Reaction). I prelievi biotipici tessutali, hanno un peso spesso esiguo, spesso inferiore a 5 mg e non garantiscono una resa sufficiente di acidi nucleici tale da rispondere ai principali quesiti diagnostici.

In ambito diagnostico tra l'altro la maggior parte dei tessuti e prelievi citologici pervengono spesso già fissati e costituiscono gran parte dell'archivio tessutale patologico.

Nel procedimento di fissazione, gli acidi nucleici subiscono un processo di degradazione talora importante ed è quindi difficile ottenere acidi nucleici di qualità adatta alle successive reazioni molecolari. Una scarsa qualità degli acidi nucleici può addirittura compromettere la riuscita delle reazioni molecolari (Volenandt et al., Polymerase chain reaction of DNA from paraffin-embedded tissue. Methods in molecular biology vol.15: current methods and application, 1993, edited BA .White, Humana Press Inc, NJ). In genere, è più critica l'estrazione di RNA che si degrada più facilmente per l'ubiquitariet  delle RNAsi e per la sua sensibilit  a pH alcalino. Ancor pi  facilmente degradabile   l'RNA virale che tra l'altro  

presente in un numero di copie inferiore all'RNA endogeno (Mizuno T. et al. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. Diagn Mol Pathol 1998;7:202-208).

Il tempo di fissazione dei tessuti è il parametro che spesso maggiormente influisce sulla resa estrattiva degli acidi nucleici (Foss RD et al Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reactions amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Diagn. Mol. Pathol 1998; 7:184-188); protocolli di lisi anche molto prolungati consentono oggi di ottenere adeguate quantità di acidi nucleici.

La rapidità estrattiva proposta da alcuni kit commerciali, in cui viene notevolmente ridotto il tempo di lisi e viene generalmente omesso il passaggio di deproteinizzazione inficia la buona resa estrattiva degli acidi nucleici specie per i tessuti fissati di archivio ed è spesso causa di presenza di impurità che possono interferire con le susseguenti procedure di biologia molecolare.

Le metodiche di estrazione simultanea di acidi nucleici finora utilizzate, che lavorano selettivamente su tessuti, cellule o liquidi biologici freschi o congelati , presentano a loro volta alcuni svantaggi.

Il metodo riportato da Coombs L.M: et al ("Simultaneous isolation of DNA, RNA and antigenic Protein Exhibiting Kinase Activity from small Tumor Samples using Guanidine Isothiocyanate", Anal. Biochem, 188, 338-343 (1990) è basato sostanzialmente sull'ultracentrifugazione del campione omogenato in una soluzione di guanidio-cloruro di cesio. Un tale protocollo consente la preparazione di un numero limitato di

campioni.

Un altro metodo di estrazione simultanea di entrambi gli acidi nucleici da uno stesso campione tessutale è riportato da Chomzynski U.S. Patent No. 5,346,994. Nel metodo il tessuto viene omogeneizzato in una soluzione di fenolo e guanidio tiocianato seguita dall'aggiunta di cloroformio e dalla successiva separazione di DNA (interfase) RNA (fase acquosa) e proteine dalla fase organica mediante l'uso di etanolo. Lo stesso inventore nella domanda WO 97/05248 propone un metodo che esclude l'utilizzo di fenolo e che si basa invece su agenti caotropici quali la guanidina tiocianato, agenti riducenti quali il 2-aminoetantiolo (sostituibile con mercaptoetanololo), e tamponi quali Na-acetato, sarcosil 0,2% ed isopropanolo. La precipitazione degli acidi nucleici viene effettuata con isopropanolo ed infine il pellet di RNA è conservato in formamide a -20°C mentre il DNA viene solubilizzato in NaOH e neutralizzato con HEPES. Il metodo assicura un recupero del 91% del DNA.

In WO 91/02740 è previsto l'utilizzo di una soluzione di lisi contenente 4M, mercaptoetanololo 0,1M, Na citrato 25 mM, 0'5% sarcosina, Na acetato 0,5 M e un polianione per la deproteinizzazione. Nel protocollo è previsto anche l'uso di circa 100 microgrammi/ml di proteinasi K. La precipitazione del DNA avviene secondo metodi standard (etanolo o isopropanolo), mentre per l'RNA viene impiegato etanolo ed acqua DEPC. Inoltre alla lisi del campione non segue una purificazione con fenolo/cloroformio con conseguente differente precipitazione degli acidi nucleici in particolare del DNA che sembra essere estratto



preferenzialmente.

Poiché attualmente sono richieste sempre più complesse indagini molecolari nell'ambito di uno stesso quesito diagnostico (per esempio: miocardite da agenti infettivi con genoma a DNA o RNA?; mutazione di un oncogene o iperespressione dello stesso?) è particolarmente sentita la necessità di poter estrarre da un unico campione entrambi gli acidi nucleici ed in quantità sufficienti a svolgere le principali indagini molecolari. Attualmente sono disponibili solo pochi protocolli o kit commerciali in grado di estrarre simultaneamente DNA ed RNA, il loro utilizzo è però limitato dalla scarsa resa e dal ristretto campo di applicazioni: liquidi organici freschi, colture cellulari e tessuti freschi oppure congelati. Inoltre non esistono a tutt'oggi protocolli che consentono di estrarre contemporaneamente gli acidi nucleici dai tessuti fissati in formalina (e inclusi in paraffina). I tessuti così conservati rappresentano la principale sorgente per routinarie indagini patologiche oltre che una importante fonte per importanti indagini retrospettive utili, oltre che a fini diagnostici, anche per ricerca.

Diventa quindi sempre più indispensabile mettere a punto protocolli per l'estrazione simultanea di DNA ed RNA da qualsiasi campione tessutale anche fissato di routine in formalina ed incluso in paraffina. A tal fine, i nuovi metodi proposti devono garantire un'estrazione molto efficiente; l'efficienza del procedimento secondo l'invenzione è tale che la sua applicazione su tessuti freschi/congelati anche di piccolissime dimensioni consente di ottenere rilevanti quantità e apprezzabili qualità di entrambi gli acidi nucleici.

SOMMARIO

L'invenzione riguarda un procedimento per isolare contemporaneamente e separatamente gli acidi ribonucleici e gli acidi deossiribonucleici da uno stesso campione biologico con peso non inferiore a 0.5 mg dove tale campione è fresco, congelato, fissato oppure è di provenienza autoptica, comprendente essenzialmente i seguenti passaggi:

- d) lisi del campione mediante incubazione in una soluzione di lisi comprendente: un agente caotropico, un detergente ionico, un enzima proteolitico, un agente riducente
- e) deproteinizzazione
- f) precipitazione separata degli acidi ribonucleici (RNA) e DNA rispettivamente dalla fase acquosa e dalla fase organica.

Secondo una realizzazione preferita la soluzione di lisi comprende: un agente caotropico scelto tra: urea o sali di guanidina, un detergente ionico scelto tra SDS ed SLS, un enzima proteolitico scelto tra: proteinasi K, tripsina, chimotripsina, pepsina, pronase ed un agente riducente scelto tra: β -mercaptoetanolo e ditione.

L'invenzione comprende in una sua realizzazione particolarmente preferita, kit per l'estrazione di acidi nucleici, anche di origine virale.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Amplificato di gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (G3PDH) mediante RT-PCR di RNA estratto con il metodo di invenzione.

La figura mostra la separazione elettroforetica su gel di agarosio di frammenti di RNA ottenuti mediante RT-PCR da campioni estratti

secondo il metodo dell'invenzione in cui la digestione con Proteinasi K è stata protratta fino a 72 ore: linea 1: RT-PCR per G3PDH del campione n° 27 (72 ore di lisi), linea 2: RT-PCR per G3PDH del campione n° 27 (12 ore di lisi), linea 3: RT-PCR per G3PDH con reagenti senza RNA (controllo negativo) linea 4: DNA marker (Fattore VIII).

Figura 2. Amplificato di β -globina mediante PCR di DNA estratto con il metodo di invenzione.

La figura mostra la separazione elettroforetica su gel di agarosio di frammenti di DNA ottenuti mediante PCR da campioni estratti secondo il metodo dell'invenzione in cui la digestione con Proteinasi K è stata protratta fino a 72 ore linea 1: PCR del campione n° 27 (72 ore di lisi): DNA marker, linea 2: PCR per β -globina del campione n° 27 (12 ore di lisi), linea 3: PCR per β -globina con reagenti senza DNA (controllo negativo) linea 4: DNA marker (Fattore VIII).

Figura 3. Amplificati virali mediante PCR di DNA ed RNA estratti secondo il metodo dell'invenzione.

Elettroforesi su gel di agarosio di RNA e DNA estratti ed amplificati rispettivamente per enterovirus ed adenovirus: linea 1 DNA marker; linea 2: RT-PCR per G3PDH (controllo di RNA estratto) del campione n° 1; linea 3: RT-PCR per enterovirus campione n° 1; linea 4: RT-PCR per G3PDH (controllo di RNA estratto) del campione n° 83; linea 5: RT-PCR per enterovirus campione n° 83; linea 6 RT-PCR per G3PDH (controllo di RNA estratto) del campione n° 3; linea 7: RT-PCR per enterovirus campione n° 83; linea 8: PCR per β -globina (controllo di DNA estratto) del campione n° 86; linea 9: PCR per adenovirus campione n° 86; linea

10:RT-PCR per enterovirus: cellule KB infettate con coxsackievirus B3 (controllo positivo); linea 11: RT-PCR per enterovirus con reagenti senza RNA (controllo negativo) linea 12: PCR per adenovirus con cellule infettate con adenovirus (controllo positivo) linea 13: PCR per adenovirus con reagenti senza DNA controllo negativo).

Figura 4. Amplificati virali mediante PCR di DNA ed RNA estratti secondo il metodo dell'invenzione.

Elettroforesi su gel di agarosio di RNA e DNA estratti da tessuti autoptici ed amplificati rispettivamente per enterovirus ed adenovirus: linea 1 DNA marker; linea 2: RT-PCR per G3PDH 234 pb (controllo di RNA estratto) campione 108; linea 3: RT-PCR per enterovirus (392 pb) campione n° 108; linea 4: PCR per β -globina 269 pb (controllo di DNA estratto) campione 106; linea 5: PCR per adenovirus (308 pb) campione n° 106; n° 114; linea 6:RT-PCR per enterovirus: cellule infettate con coxsackievirus B3 (controllo positivo); linea 7: RT-PCR per enterovirus reagenti senza RNA (controllo negativo) linea 8: PCR per adenovirus: cellule infettate con adenovirus (controllo positivo) linea 9: PCR per adenovirus reagenti senza DNA (controllo-negativo).



Figura 5. Amplificati virali mediante PCR di DNA ed RNA estratti secondo il metodo dell'invenzione.

Rilevazione del virus ad RNA (HCV) in un frammento cardiaco rimasto in formalina per oltre 1 anno. Linea 1: Marker VIII: linea 2: Campione n°40; linea 3: Campione n°41; linea 4: Campione n°42; linea 5: Campione n°43; linea 6: Campione n° 44; linea 7: Controllo negativo di estrazione; linea 8: Controllo positivo per HCV.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda un metodo per l'estrazione di entrambi gli acidi nucleici, acido ribonucleico (RNA) e deossiribonucleico (DNA), da un materiale biologico di partenza costituito da una biopsia, da un frammento o da una sezione, dove tale campione può essere fresco, congelato oppure anche fissato ed è di dimensioni non inferiori a 0.5 mg. Il metodo, sorprendentemente, consente una buona resa estrattiva (sia in termini quantitativi che qualitativi) di entrambi gli acidi nucleici anche da frammenti autoptici. Nel prosieguo della domanda il metodo dell'invenzione è anche denominato "simultaneous".

Secondo il metodo, il materiale biologico di partenza sminuzzato finemente, ma non omogeneizzato, è denaturato mediante incubazione in una soluzione di lisi comprendente: un agente caotropico preferibilmente scelto tra urea o sali di guanidina, un detergente ionico preferibilmente scelto tra SLS o SDS, un enzima proteolitico scelto tra: proteinasi K, tripsina, chimotripsina, pepsina, pronase, preferibilmente proteinasi K, ed un agente riducente. Preferibilmente il detergente ionico è SLS, in concentrazioni comprese tra 0.01% e 2% ancor più preferibilmente tra 0.2% e 1%.

Nella soluzione di lisi l'agente caotropico è preferibilmente costituito da sali di guanidina, ancor più preferibilmente da guanidina tiocianato in concentrazione compresa tra 1-4 M, l'enzima proteolitico è preferibilmente costituito da proteinasi K in concentrazione compresa tra 0.1 e 10 mg/ml, ancor più preferibilmente compresa tra 0.5-8 mg/ml. In particolare la proteinasi K è preferibilmente aggiunta ad una

concentrazione finale compresa tra 1 e 2 mg/ml quando il tessuto è fresco o congelato e ad una concentrazione compresa tra 4 e 6 mg/ml quando il tessuto è fissato. La soluzione di lisi comprende inoltre un agente riducente quale DTT o β -mercaptoetanololo, preferibilmente β -mercaptoetanololo.

Il sistema tampone utilizzato nella soluzione di lisi ha pH neutro, preferibilmente compreso tra 6.8 e 7.3, ancor più preferibilmente compreso tra 6.9-7.17 ed è preferibilmente Na-citrato in concentrazione compresa tra 5 e 100 mM, ancor più preferibilmente compresa tra 10-35 mM;

Dopo aver aggiunto la soluzione di lisi al campione, secondo il punto a) del procedimento, vengono inoltre aggiunti inibitori delle ribonucleasi, preferibilmente il Vanadyl-Ribonucleoside Complex in concentrazioni finali note, preferibilmente comprese tra 10 e 200 μ M, più preferibilmente tra 50 e 100 μ M ed un agente coadiuvante la precipitazione degli acidi nucleici, per brevità agente precipitante, quale tRNA o glicogeno, preferibilmente quest'ultimo, in concentrazione compresa tra 1-200 ng/ml, ancor più preferibilmente tra 50 e 100 ng/ml. L'aggiunta dell'agente coadiuvante la precipitazione può essere effettuata anche in un passaggio successivo, ossia prima della precipitazione degli acidi nucleici mediante aggiunta di alcool.

La soluzione è mantenuta a temperatura superiore a 15°C, preferibilmente superiore a 25°C, ancor più preferibilmente superiore a 30° e compresa fra 35°C e 42°C, per un tempo non inferiore a 5 ore ancor più preferibilmente superiore a 10. Quando si deve ottenere la lisi

di tessuti particolarmente resistenti, e/o più frequentemente fissati il tempo di incubazione può essere aumentato, opzionalmente aggiungendo anche una ulteriore aliquota dell'enzima proteolitico.

Nel caso in cui il tessuto o la biopsia provengano da sezioni paraffinate, la paraffina deve essere prima rimossa mediante un opportuno trattamento di deparaffinizzazione prima di aggiungere la soluzione di lisi. Secondo questo particolare aspetto il campione viene tagliato, preferibilmente con un microtomo in un certo numero di sezioni aventi un peso complessivo compreso tra 0.5 e 20 mg, corrispondenti all'incirca a 15-30 sezioni di ca 10 μm per le biopsie, ed a circa 1-4 sezioni per i frammenti, stesso spessore di circa 10 micron, sparaffinate mediante una prima incubazione con xilolo o con reagenti commercialmente disponibili, quali ad esempio HistoClear™, o con derivati del benzene, preferibilmente ad una temperatura superiore a 30°C, ancor più preferibilmente superiore a 35°C. Dopo deparaffinizzazione con xilolo il campione viene lavato con uno stesso volume di un alcol, preferibilmente alcool etilico assoluto, oppure con acetone.

Dopo aver eliminato secondo questo procedimento la paraffina, il campione viene trattato con la soluzione di lisi come un campione fresco o congelato, in accordo con il punto a) del procedimento.

Secondo un ulteriore aspetto preferito nel caso particolare in cui si abbia a che fare con un prelievo fissato, ad esempio in formalina, ma non incluso in paraffina, il campione può essere trattato con allumina (Al_2O_3). Una volta prelevato il campione dalla formalina o dalla soluzione fissante, il prelievo è prima essiccato in una stufa a secco (per circa 2h a

30-35°C) e poi trattato con allumina (aggiunta in eguale quantità del peso del frammento tessutale essiccato). Dopo aver mescolato il composto per qualche minuto il miscuglio è incubato nella soluzione di lisi e processato in accordo con il metodo dell'invenzione.

Il miscelamento con la polvere di allumina causa una continua abrasione tra i granelli di allumina e il tessuto, favorendo la frammentazione tissutale e cellulare che porta alla rottura delle membrane e alla conseguente fuoriuscita di materiale intracellulare, compresi gli acidi nucleici. Il metodo dell'invenzione è stato applicato con successo all'estrazione di acidi nucleici, in particolare virali, da frammenti cardiaci rimasti in formalina oltre 1 anno (Figura 5).

Secondo la realizzazione principale del procedimento il campione denaturato dopo incubazione nella soluzione di lisi, viene deproteinizzato secondo il punto b) del procedimento, mediante aggiunta di uno stesso volume di fenolo o di una miscela di fenolo-cloroformio (in rapporto vol/vol compreso tra 3:1 e 7:1) preferibilmente in rapporto 5:1, a pH acido, preferibilmente inferiore a pH 5, miscelando ripetutamente la fase acquosa e la fase organica, secondo metodi noti nell'arte. La fase acquosa può essere opzionalmente riestratta per eliminare eventuali residui fenolici, miscelandola ulteriormente con cloroformio. L'RNA viene quindi precipitato dalla o dalle fasi acquose in accordo con il punto c) del procedimento, mediante aggiunta di alcool alifatici a catena corta, quale alcool isopropilico o etanolo, preferibilmente isopropanolo mantenendo per almeno 30' la provetta a temperatura inferiore a -20°C, preferibilmente inferiore a -50°C o ancor



più preferibilmente a -80°C . Opzionalmente l'estrazione con fenolo o con la miscela fenolo-cloroformio può essere ripetuta più volte.

Le fasi organiche contenenti fenolo sono conservate per l'estrazione di DNA che viene effettuata solo successivamente, secondo il punto d) del procedimento. Il DNA viene precipitato mediante aggiunta di etanolo assoluto alla fase organica e di un agente coadiuvante la precipitazione (anche "agente precipitante") quale glicogeno o tRNA, nelle concentrazioni sopra indicate, incubando poi a temperatura ambiente per qualche minuto.

I volumi di alcool aggiunti per la precipitazione degli acidi nucleici sono effettuati secondo proporzioni note al tecnico del ramo. Anche eventuali quantità, concentrazioni o soluzioni non esplicitamente specificate nel presente metodo possono essere dedotte da un tecnico dal ramo in accordo con quanto pubblicato in un manuale di tecniche di biologia molecolare, quale ad esempio Sambrook and Maniatis, "Molecular Cloning", CSH Edition, 1988.

Sorprendentemente, tale protocollo consente di estrarre simultaneamente quantità di acidi nucleici superiori a quelle ottenibili con altri protocolli o kit commerciali, e in particolare consente di ottenere materiale di buona qualità anche da campioni non preservati idoneamente, ad esempio da campioni tessutali rimasti in fissativo per un periodo superiore ai 3 giorni o fino a diversi anni.

Le rese del metodo dell'invenzione sono superiori ai più comuni metodi di estrazione simultanea dei due acidi nucleici comparati direttamente nella parte sperimentale della presente domanda oppure in base alle

rese fornite. Il metodo dell'invenzione risulta superiore anche a metodi ottimizzati per l'estrazione di un solo acido nucleico (DNA o RNA), quali ad esempio il metodo di Blin e Stafford e quello di Chomczynski e Sacchi, le cui rese sono confrontabili in tabella 5 della presente descrizione e consente di ottenere acidi nucleici in quantità sufficiente anche da basse quantità di materiale di partenza. Ulteriori vantaggi del metodo sono rappresentati dal fatto di utilizzare concentrazioni relativamente basse di agente denaturante nella soluzione di lisi e dal fatto di non prevedere passaggi di ultracentrifugazione, risultando quindi adatto anche ai laboratori meno attrezzati.

Il metodo consente inoltre l'estrazione di acidi nucleici anche da tessuti autoptici ottenendo da questi una buona resa di acidi nucleici sia in termini quantitativi che qualitativi. In particolare da suddetti tessuti è stato possibile estrarre anche acidi nucleici virali anche ad RNA generalmente presenti in un numero di copie inferiore rispetto a quelle di mRNA endogeno.

Le rese ottenute con il metodo dell'invenzione, comparate con i metodi noti, sono state valutate per frammenti di tessuto di peso compreso tra 0.5 e 20 mg, estratti con una quantità di soluzione di lisi non inferiore a 300 μ l.

Per i tessuti congelati le quantità di RNA totale ottenuto secondo il metodo dell'invenzione non sono inferiori a 15 μ g, in alcuni casi e a partire da una quantità di materiale di partenza superiore a 10 mg, non inferiori a 20 μ g ed in alcuni casi superiori a 50 μ g (53.8 μ g).

Per il DNA invece, le rese calcolate a partire dalle quantità minime di



materiale di partenza danno rese non inferiori ad 1 μg , in alcuni casi superiori a 10 μg , per quantità di materiale di partenza superiore a 10 mg.

Per campioni costituiti da tessuti fissati le rese variano tra 2,5 e 20 μg di RNA per sezioni di tessuti inferiori a 20 mm^2 e tra 8,8 e 26 μg di RNA per sezioni di tessuti superiori a 20 mm^2 (fino ad oltre 1 cm^2). Per il DNA le rese variavano da 0,2 a 1,6 per sezioni di tessuti inferiori a 20 mm^2 e da 1,6 a 8,2 per sezioni di tessuti superiori a 20 mm^2 .

La qualità degli acidi nucleici dell'invenzione è stata verificata mediante positività alla reazione di PCR con oligonucleotidi specifici per geni sicuramente espressi in tutti i tessuti (*house-keeping genes*) e, attraverso un ulteriore metodo analitico che valuta il rapporto tra A260/A280, che risulta essere compreso tra 1.4 e 2 o ancor più preferibilmente tra 1.5 e 1.8.

Nella reazione di PCR, l'RNA è stato previamente retrotrascritto con trascrittasi inversa. La positività nella reazione di PCR nel 100% dei casi degli acidi nucleici estratti da materiale fresco o congelato e nel 93% dei casi di acidi nucleici estratti da tessuti fissati, ed un rapporto ottimale A260/A280 nella maggior parte dei campioni, indica che gli acidi nucleici ottenuti con il metodo dell'invenzione sono purificati in modo adeguato ad un loro eventuale utilizzo successivo per applicazioni di biologia molecolare.

Secondo una realizzazione preferita e dettagliata del procedimento, in una forma sintetica che ne può costituire anche un foglietto di istruzioni, il campione, dopo essere stato sminuzzato (ma non omogeneizzato)

utilizzando la lama, preferibilmente sterile, di un bisturi, viene:

- a) incubato in una soluzione di lisi definita come sopra, dove tale miscela del campione nella soluzione di lisi potrà anche essere definita "fase acquosa" nella descrizione, quando addizionata o posta a contatto con una "fase organica", quale ad esempio quella costituita da fenolo oppure dalla miscela fenolo cloroformio oppure da cloroformio. Opzionalmente, se il campione non risulta lisato ad un esame visivo, può essere aggiunta una ulteriore aliquota di un enzima proteolitico ed il campione ulteriormente incubato,
- b) la soluzione di lisi contenente il campione (fase acquosa) viene estratta con una miscela deproteinizzante costituita da fenolo oppure da fenolo-cloroformio a pH acido (fase organica), ed opzionalmente la fase acquosa può essere successivamente estratta con cloroformio, ripetendo preferibilmente tale passaggio almeno due volte. Opzionalmente, alla fase organica viene aggiunta una ulteriore quantità di una soluzione acquosa o di acqua trattata/e con inibitori delle ribonucleasi ad esempio con DiEtilPiroCarbonato (DEPC). Quindi, la o le fase/i organica/he vengono conservate per l'estrazione di acido deossiribonucleico (DNA),
- c) la soluzione acquosa e/o l'H₂O di cui ai punti precedenti vengono unite alla soluzione di lisi contenente il campione e quindi l'acido ribonucleico (RNA) viene precipitato mediante aggiunta di un alcool preferibilmente isopropanolo alifatico a catena corta e di un agente coadiuvante la precipitazione (quale glicogeno o tRNA), nelle concentrazioni finali sopra definite e quindi i sali in eccesso possono



essere rimossi dal precipitato, opzionalmente, mediante lavaggio con un alcool alifatico a catena corta diluito con acqua, preferibilmente con etanolo diluito in acqua al 70-80%. L'aggiunta di glicogeno e di un inibitore delle RNAsi in questo passaggio non è obbligatoria, in quanto essi possono essere aggiunti anche nei passaggi precedenti, purchè prima della precipitazione con isopropanolo, la concentrazione di glicogeno non sia inferiore a 10 ng/ml, o preferibilmente in concentrazione compresa tra 10-200 ng/ml, ancor più preferibilmente tra 50 e 100 ng/ml. Costituisce tuttavia un'applicazione preferita del metodo l'aggiunta di glicogeno sia a questo punto che al punto a) del procedimento, immediatamente dopo o al momento dell'aggiunta della soluzione di lisi,

- d) il DNA viene quindi isolato dalle fasi organiche conservate nei passaggi precedenti precipitandolo mediante aggiunta di un alcool alifatico a catena corta, preferibilmente etanolo e di un agente coadiuvante la precipitazione, preferibilmente glicogeno (la precipitazione avviene preferibilmente dopo una breve incubazione a temperatura ambiente). Dal precipitato così ottenuto possono essere rimosse le tracce di fenolo mediante lavaggio con una soluzione salina, preferibilmente NaCl o Na-citrato in concentrazione 10-200 mM, preferibilmente 80-120 mM, ancor meglio 100 mM, comprendente almeno il 5% di un alcool alifatico a catena corta, preferibilmente etanolo, e dove tale lavaggio è preferibilmente ripetuto almeno 2-3 volte.

L'invenzione comprende inoltre la realizzazione di kit per l'estrazione

contemporanea e separata di RNA e DNA da campioni biologici freschi, fissati o autoptici, opzionalmente anche paraffinati, secondo il metodo dell'invenzione, dove tale kit comprende un tubo con una soluzione di lisi, un tubo con un agente precipitante, un tubo con un inibitore delle endoribonucleasi etc. ed un foglietto illustrativo riportante il metodo dell'invenzione nella sua forma dettagliata ed opzionalmente tubi sterili e trattati con inibitori delle ribonucleasi, lame monouso etc..

Secondo un ulteriore aspetto inoltre, l'invenzione comprende un kit per l'estrazione di acidi nucleici virali da campioni biologici freschi, fissati o autoptici, opzionalmente anche paraffinati, secondo il metodo dell'invenzione, comprendente più tubi con oligonucleotidi specifici per la rilevazione di uno o più agenti virali mediante PCR, un foglietto illustrativo riportante il metodo dell'invenzione nella sua forma dettagliata ed opzionalmente tubi contenenti i reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA (quali ad esempio l'enzima DNA polimerasi RNA dipendente, random primers, oppure primers oligodT esanucleotidi).

PARTE SPERIMENTALE

Reagenti

- Xilolo [CARLO ERBA]
- Alcol etilico assoluto [MERCK]
- Acqua bidistillata sterile
- Acqua DEPC (acqua trattata con 0.1% dietilpirocarbonato in agitazione per almeno 12 ore, quindi riscaldata a 100° C per 15 minuti o autoclavata)
- Guanidio tiocianato [SIGMA] (9.456 gr a 10 ml H₂O=8 M)

- 2-Mercaptoetanol [*SIGMA*]
- N-Lauril-Sarcosina [*SIGMA*]
- Proteinasi K (DNase-RNase free) [*BOEHRINGER*]
- Vanadil Ribonuclease Complex [*SIGMA*] (200 mM)
- Glicogeno [*BOEHRINGER*] (20 mg/ml)
- Fenolo:cloroformio 5:1 pH 4.7 [*SIGMA*] Cloroformio [*SIGMA*]
- Isopropanolo [*MERCK*]
- Citrato di sodio 0.5 M pH 7 [*BAKER*]
- Etanolo 75% [*MERCK*]

Materiale d'uso

- Microtomo [*Jung SM 2000 R-LEICA*]
- Lame da microtomo monouso
- Provette sterili "RNase DNase free" [*EPPENDORF*]
- Puntali sterili "RNase DNase free" con o senza filtro, da 10, 100 e 1000 μ l [*EPPENDORF*]
- Micropipette e pipette a spostamento positivo [*EPPENDORF*]
- Spettrofotometro [*15 PERKIN ELMER*]
- Termociclatore [*PERKIN ELMER 2400*]

Campioni.

Furono utilizzati frammenti e biopsie prelevati da diversi tessuti, sia congelati in azoto liquido che fissati in formalina tamponata al 10% e/o inclusi in paraffina.

In particolare furono processati:

- a) 25 campioni biotipici (1-9 mg) congelati in azoto liquido (n.10 biopsie endomiocardiche, n.5 biopsie epatiche, n.5 biopsie cutanee e n.5



biopsie transbrochiali),

- b) 25 frammenti tessutali (10-20 mg) congelati in azoto liquido (n.10 frammenti di miocardio, n. 10 frammenti di polmone, n. 5 frammenti di tiroide),
- c) 25 campioni biotici (area 3-20 mm²) fissati in formalina tamponata al 10% per un periodo < 12 h e inclusi in paraffina (n.10 biopsie endomiocardiche, n.5 biopsie transbronchiali, n.5 biopsie cutanee, n.5 biopsie gastriche),
- d) 30 frammenti chirurgici tessutali (area 30-80 mm²) fissati in formalina tamponata al 10% per un periodo > 3 giorni fino ad un massimo di 7 giorni e successivamente inclusi in paraffina (n.10 frammenti di fegato, n.8 frammenti di stomaco, n.7 frammenti di cute, e n.5 di miocardio),
- e) 15 frammenti tessutali (area 30-80 mm²) di provenienza autoptica fissati in formalina tamponata al 10% per un periodo > 3 giorni fino ad un massimo di 7 giorni e successivamente inclusi in paraffina (n.5 frammenti di cuore, n.5 frammenti di polmone e n.5 frammenti di fegato).

Nel caso di prelievi tessutali congelati con peso superiore a 1mg è stata effettuata una delicata frammentazione con bisturi ed immediata immersione nella soluzione di lisi.

Del tessuto fissato sono state utilizzate 15-20 sezioni di 10 µ per le biopsie e 1-4 sezioni dello stesso spessore per i frammenti tessutali.

I campioni biotici e i frammenti chirurgici e autoptici fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati scelti in maniera casuale tra materiale di



archivio.

Al fine di diminuire l'incidenza di manualità diverse, i tessuti congelati e fissati vennero processati sempre dagli stessi operatori.

Esempio 1. Estrazione di RNA da tessuti o biopsie congelati e/o fissati.

I tessuti congelati in quantità da 1 a 9 mg, in particolare circa 1.5 mg/ml (tessuti congelati) e biopsie fissate, aventi una superficie da 3 a 20 mm², in media di circa 10 mm² sono stati dapprima sminuzzati finemente e quindi immersi in 400 µl di *soluzione di lisi* con la seguente composizione:

2M	Guanidio tiocianato,
0.1 mM	2-Mercaptoetanololo
25 mM	Na citrato pH 7
0.5%	N-Lauril Sarcosina,

contenente proteinasi K alla concentrazione di 2 mg/ml (biopsie congelate) e 5 mg/ml (biopsie fissate). Alla soluzione di lisi vennero quindi aggiunti 4 µl "Vanadyl Ribonucleasid Complex" ed 1 µl glicogeno. La soluzione venne quindi incubata a 40°C overnight.

I tessuti di circa 60 mg, fissati in formalina, vennero dapprima essiccati in una stufa a secco (per circa 2h a 30-35°C) e poi trattati con allumina (aggiunta in eguale quantità del peso del frammento tessutale essiccato). Dopo aver mescolato per qualche minuto, il miscuglio fu incubato nella soluzione di lisi e processato in accordo con il metodo dell'invenzione. Come esempio dell'efficienza di questa variante del metodo, si può osservare la riuscita rilevazione di un virus ad RNA

(HCV) in un frammento cardiaco rimasto in formalina per oltre 1 anno (Figura 5).

I tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina vennero invece tagliati al microtomo in sezioni (15-30 sezioni per le biopsie ed 1-4 sezioni per i frammenti tissutali) di 10 μm di spessore usando per ciascun blocchetto di tessuto una lama nuova. Quindi le fettine vennero raccolte in una provetta sterile "RNase DNase free" usando una pinza pulita, il tessuto venne "sparaffinato" mediante aggiunta di 1 ml di xilolo e quindi incubato a 37°C per 20 minuti, centrifugato a 12000 rpm a 4°C per 3 minuti, lo xilolo venne decantato, ripetendo i passaggi dall'aggiunta di xilolo altre due volte; venne quindi aggiunto 1 ml di alcool etilico assoluto ed effettuata un'incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti, la soluzione venne centrifugata a 12000 rpm a 4°C per 3 minuti e l'etanolo decantato, ripetendo altre due volte i passaggi dall'aggiunta di etanolo.

Il pellet così ottenuto venne lasciato asciugare e quindi risospeso in 400 μl di soluzione di lisi, lasciato a 37°C tutta la notte e quindi nel caso in cui non fu osservata lisi completa, ulteriormente incubato con altri 80-100 μg di proteinasi K lasciando a 37°C per altre 24 ore.

Per i tessuti di archivio costituiti da frammenti chirurgici con superficie da un minimo di 30 mm^2 ad oltre 1 cm^2 la digestione con la soluzione di lisi venne protratta fino a 72 ore, ottenendo in questa maniera un amplificato di G3PDH migliore che quelli ottenuti con una digestione più breve (Fig.1a).

Sia per i tessuti congelati che di archivio si proseguì nel modo seguente: venne aggiunto uno stesso volume di fenolo/cloroformio (5:1, pH 4.7), il

campione venne agitato ripetutamente per inversione e quindi centrifugato a 12000 rpm a 4°C per 5 min. Il sovranatante (fase acquosa contenente l'RNA) venne quindi trasferito in una nuova provetta, vennero aggiunti 100-200 µl di acqua DEPC alla provetta di partenza e quindi il campione venne agitato ripetutamente per inversione e centrifugato a 12000 rpm a 4°C per 5 minuti, trasferendo il supernatante nello stesso tubo contenente quello precedente e conservando la fase organica a 4°C per l'estrazione successiva del DNA.

Quindi alla fase acquosa venne aggiunto uno stesso volume di fenolo/cloroformio, miscelando ripetutamente per inversione e centrifugando quindi a 12000 rpm per 5 minuti; la fase acquosa venne trasferita in una nuova provetta e la fase organica conservata a 4°C per la successiva estrazione del DNA.

Quindi, alla fase acquosa venne aggiunto uno stesso volume di cloroformio, miscelando ripetutamente per inversione e centrifugando a 12000 rpm per 5 minuti. La fase acquosa venne quindi trasferita in una nuova provetta, venne aggiunto un ugual volume di isopropanolo, la provetta venne invertita alcune volte e quindi lasciata a precipitare per 1 ora a -80°C. L'RNA venne quindi pellettato mediante centrifugazione a 12000 rpm a 4°C per 15 minuti, l'isopropanolo rimosso e quindi venne effettuato un lavaggio con etanolo 75% a freddo, il "pellet" venne quindi fatto asciugare (max 5 minuti) e risospeso in 20 µl di acqua DEPC. L'estratto venne quindi dosato mediante lettura spettrofotometrica e conservato a -80°C.

Fu possibile estrarre RNA sia da campioni biotici congelati che da

quelli fissati ed inclusi in paraffina.

La resa di RNA fu valutata con il metodo spettrofotometrico. Risultò essere compresa tra un minimo di 0,76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ed un massimo di 1,57 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ per le biopsie congelate e tra 0,12 a 0,99 per le biopsie fissate (Tabelle 5 e 6) per 20 μl di soluzione totale. Mediamente, con il protocollo Simultaneus furono estratti 15,2-31,4 μg totali di RNA da 1-9 mg di tessuto congelato. I migliori risultati furono ottenuti da biopsie congelate di fegato (da 0,93 a 1,57 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Il peso delle biopsie congelate (1-9 mg) non influenzava significativamente la resa di RNA; infatti nell'ambito dello stesso tipo tessutale furono a volte ottenute quantità superiori processando biopsie di minori dimensioni.

Il rapporto A260/A280 misurato riportava valori ottimali compresi tra 1.5-2.0 in tutti gli estratti da tessuti congelati e fissati (Tabelle 5 e 6).

RNA fu estratto anche da tutti i frammenti tessutali saggiati, sia congelati che fissati. La resa di RNA risultava essere compresa tra 1,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 2,69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ per i tessuti congelati e da un minimo di 0,44 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ad un massimo di 1,33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ di per i tessuti fissati. In sommario con il metodo dell'invenzione furono estratti 24,4-53,8 μg RNA da 10-20 mg di tessuto. Anche il rapporto di assorbanza A260/280 riportava valori ottimali di 1,5-2 in tutti gli estratti da frammenti congelati o fissati.

Esempio 2. Estrazione di DNA dalla fase organica ottenuta secondo l'esempio 1.

Le provette contenenti la fase organica conservate a 4°C provenienti dai passaggi di estrazione dell'RNA descritto nell'esempio 1, furono



[Handwritten signature]

trattate come segue per l'estrazione anche del DNA. La fase acquosa fu completamente rimossa ed il DNA precipitato dalla fase organica mediante aggiunta di 1 μ l di glicogeno, 200 μ l di etanolo 100%, miscelazione per inversione ed incubazione per 2-3 minuti a temperatura ambiente, seguita da centrifugazione a 12000 rpm a 4°C per 5 minuti e decantazione del supernatante.

Quindi, le tracce di fenolo vennero rimosse per aggiunta di 0.1 M Na citrato in 10% etanolo (100 μ l ogni 100 di soluzione di lisi) e dopo un'incubazione di 30' a temperatura ambiente il campione fu centrifugato a 12000 rpm a 4°C per 5 minuti e il supernatante rimosso. Il lavaggio con Na citrato venne ripetuto altre 2 volte, il "pellet" di DNA fu lavato con 200 μ l di etanolo 75% ogni 100 μ l di soluzione di lisi usata in precedenza e venne quindi incubato 10-20 minuti a temperatura ambiente, mescolando occasionalmente. Il pellet, nuovamente lavato ed asciugato, venne quindi risospeso in H₂O sterile ed unito al pellet ottenuto dall'estrazione della seconda provetta. Il DNA estratto venne conservato a -4° C fino al momento dell'uso.

In tutti i campioni biotici sia congelati che di archivio fu possibile estrarre DNA con un "range" di concentrazione da 0,09 μ g/ μ l a 0,2 μ g/ μ l per le biopsie congelate (Tab 5) e da 0,01 a 0,08 per le biopsie fissate (Tab 6). Si è calcolato che con il metodo dell'invenzione denominato anche *Simultaneus* si è in grado di estrarre 1,8-3,8 μ g di DNA da 1-9 mg di tessuto congelato. Contrariamente che per l'RNA non si sono osservate differenze in termini di concentrazioni per differenti tipi tissutali. Il peso della biopsia (1-9 mg) non ha sostanzialmente

modificato la concentrazione di DNA estratto. Il rapporto A260/A280 misurato riportava valori ottimali (compresi tra 1.5-1.8) in 16/25 campioni biotipici congelati (64%) e nell'80% dei campioni fissati.

Il DNA fu estratto da tutti i frammenti tessutali congelati e fissati con ranges di concentrazione che variavano da un minimo di 0,29 ad un massimo di 0,67 per i tessuti congelati e da un minimo di 0,08 ad un massimo di 0,41 di per i tessuti fissati. Con il nostro protocollo si possono quindi estrarre da 5,8 a 13,4 μg DNA da 10-20 mg di tessuto. La quantità di DNA estratto con il protocollo di Blin e Stafford era di gran lunga inferiore e compreso tra 0,1 e 0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Tab. 5), così come inferiore risultava quella estratta con il kit commerciale Omnizol da 0,1 a 0,32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Esempio 3. Amplificazione mediante PCR degli acidi nucleici estratti con il metodo dell'invenzione.

La reazione di amplificazione mediante (PCR) venne effettuata su un gene e un RNA messaggero normalmente presenti in tutte le cellule umane: il gene della β -globina (per il DNA) e l'mRNA della gliceraldeide 3-fosfato-deidrogenasi (G3PDH) per l'RNA, per la valutazione analitica di entrambi gli acidi nucleici estratti.

I "primers" utilizzati per la PCR furono purificati in HPLC. Essi avevano una lunghezza massima di 21 paia di basi (acquistati da Amersham Pharmacia Biotech).

Le condizioni di amplificazione e di retrotrascrizione con successiva amplificazione del cDNA sono riassunte nelle tabella 2, 3 e 4. Gli amplificati furono sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio NU-SIEVE

3:1 e fotografati al transilluminatore UV.

Si ottenne un buon amplificato per il gene della β -globina in tutti i campioni biotici congelati e fissati.

Gli acidi nucleici estratti secondo il procedimento dell'invenzione furono inoltre utilizzati per la ricerca di sequenze genomiche virali di enterovirus ed adenovirus da campioni diagnostici (15 campioni rispettivamente costituiti da 10 biopsie e 5 frammenti autoptici).

La sequenza nucleotidica dei primers, la loro lunghezza e la loro ottimale temperatura di "annealing" sono riportate in tabella 1.

Tabella 1. Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione.

NOME	LUNGHEZZA AMPLIFICATO	Temp. di "annealing"
G3PDH [#]	234 pb	50°C
β globina [*]	269 pb	44° C
Enterovirus [◇]	391 pb	55° C
Adenovirus [°]	308 pb	57° C

[#] referencia: Ercolani L et al. J. Biol. Chem.1988;263:1535-41.

^{*} referencia: Saiki RK et al. Science 1985;230:13450-4

[◇] referencia: Gama RE et al. J Med. Virol.1989;28:73-7.

[°] referencia: Lozinski GM et al. Hum. Pathol. 1994;25:831-834.

Le condizioni di amplificazione mediante PCR sono riportate in tabella 2.

Tabella 2. Condizioni di amplificazione.

REAGENTI	CONC. FINALE	QUANTITA'
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	5 μ l
Tampone di reazione* 10X	1X	5 μ l
"Primers" 20 pmoli/ μ l	20 pmoli (di ognuno)	1 μ l
Taq polimerasi 5U/ μ l	1.2 U	0,25 μ l
Deossinucleotidi 10 mM	200 μ M (di ognuno)	1 μ l (di ognuno)

* Tampone di reazione: buffer tampone per l'enzima Taq polimerasi fornito dalla ditta Perkin Elmer

Per ogni amplificazione portata ad un volume finale di 50 μ l con acqua distillata sterile utilizzando circa 1 μ g di DNA.

Per ciascuna amplificazione si seguì il seguente schema:

- denaturazione iniziale	3'	94°		1X
- denaturazione	1'	94°C		\
- "annealing"	1'	(T° specifica)		> 30 cicli
- estensione	1'	72°C		/
- estensione finale	7'	72°C		1X



RNA. l'RNA estratto secondo il metodo descritto nell'esempio 1 fu dapprima retrotrascritto e quindi amplificato per la gliceraldeide 3-fosfato-deidrogenasi.

Le condizioni di retrotrascrizione sono riassunte in tabella 3.

Tabella 3. Condizioni di retrotrascrizione (RT)

REAGENTI	CONC. FINALE	QUANTITA'
MgCl ₂	5 mM	4 μ l
Tampone di reazione	1X	2 μ l
"Primer downstream"	20 pmoli	1 μ l
Inibitore delle RNAsi 20U/ μ l	1 U/ μ l	1 μ l
Deossinucleotidi	1 mM (di ognuno)	2 μ l (di ognuno)
MuLV Reverse Transcriptase 50U/ μ l	2.5 U/ μ l	1 μ l

*Tampone di reazione: buffer tampone per l'enzima MuLV fornito dalla ditta Perkin Elmer.

Per ogni retrotrascrizione (volume finale 20 μ l) venne utilizzato non meno di 1 μ g di RNA. Per ciascuna retrotrascrizione fu seguito il

12/11

seguente schema:

- retrotrascrizione 50' 42°C
- denaturazione dell'enzima 5' 99°C

Quindi il campione venne portato rapidamente a 4°C. Le condizioni di amplificazione del campione di cDNA retrotrascritto dall'RNA sono sintetizzate in tabella 4.

Tabella 4. Condizioni di amplificazione mediante PCR con DNA retrotrascritto

REAGENTI	CONCENTRAZIONI	QUANTITA'
MgCl ₂	2 mM	2 µl
Tampone di reazione*	1X	4 µl
"Primer upstream"	20 pmoli	1 µl
Taq polimerasi	1.2 U	0,25µl

Per ciascuna amplificazione, portata ad un volume finale di 100 µl con 20 µl di cDNA derivante dalla retrotrascrizione fu seguito lo schema seguente:

- denaturazione iniziale 2' 95°C | 1X
- denaturazione 30 sec 95°C | \
- "annealing" 30 sec (T° spec.) | > 30 cicli
- estensione 1' 72°C | /
- estensione finale 7' 72°C | 1X
- mantenimento a 4°C.

Si ottenne un buon amplificato per la gliceraldeide 3-fosfato-deidrogenasi da tutti gli RNA estratti da frammenti congelati e nel 93% (42/45) di quelli ottenuti da frammenti fissati. I 3 campioni in cui non si ottenne una idonea retrotrascrizione e amplificazione per la gliceraldeide 3-fosfato-deidrogenasi riguardavano tessuti autoptici fissati in formalina.

In ogni caso i controlli effettuati escludevano che i negativi fossero falsi negativi dovuti ad esempio ad errori della reazione di retrotrascrizione ed amplificazione. Infatti, tutti i campioni furono sempre processati contemporaneamente con controlli di RNA positivi nell'amplificazione con i primers di gliceraldeide 3-fosfato-deidrogenasi.

Per i campioni negativi l'amplificazione fu ripetuta in ciascun caso almeno 3 volte: 1) utilizzando la stessa quantità di RNA della reazione precedente 2) raddoppiando la quantità di RNA 3) dimezzando la quantità di RNA utilizzato. In nessun caso si è ottenuta una variazione del risultato.

Da DNA: si ottenne un buon amplificato per il gene della β -globina in tutti i frammenti congelati e nel 91% (41/45) dei frammenti fissati.

Per verificare che non vi fossero falsi negativi dovuti ad errori della reazione di amplificazione, furono sempre processati contemporaneamente ai nostri campioni, controlli positivi costituiti da DNA estratto da tessuti congelati precedentemente amplificati per la β -globina.

Per i campioni la cui estrazione risultò negativa l'amplificazione fu ripetuta in ciascun caso almeno 3 volte: 1) utilizzando la stessa quantità di DNA della reazione precedente, 2) raddoppiando la quantità di DNA 3) dimezzando la quantità di DNA utilizzato.

In nessun caso si ottenne una variazione del risultato. Per i tessuti di archivio costituiti da frammenti chirurgici con superficie compresa fra 30 mm² e > 1cm² la digestione con la soluzione di lisi fu protratta per un intervallo di tempo da 24 a 72 ore, ottenendo in questa maniera anche

per il DNA un amplificato di β -globina migliore che quelli ottenuti con una digestione più breve (Fig.2).

In 4 campioni biotici di miocardio (2 biopsie congelate e 2 fissate in formalina) prelevati da pazienti con diagnosi clinica ed istologica di miocardite, si è anche ottenuto un buon amplificato per l'enterovirus e l'adenovirus (Fig.3). Anche in 3 frammenti tessutali autotici di pazienti con diagnosi clinica ed istologica di miocardite e polmonite si è riusciti ad amplificare sequenze genomiche virali (Fig. 4).

Esempio 4. Comparazione delle rese medie di estrazione degli acidi nucleici secondo il metodo dell'invenzione oppure con i metodi dell'arte nota.

Su ciascun campione fu effettuata sia la determinazione spettrofotometrica quantitativa che qualitativa, mediante calcolo del rapporto 260/280. Inoltre venne effettuata una amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) di un gene e di un RNA messaggero normalmente espressi in tutte le cellule umane (vedi esempio successivo).

In particolare l'estrazione di DNA da materiale fresco o congelato fu effettuata secondo il protocollo che prevede l'utilizzo di una soluzione di lisi con EDTA, TRIS-HCL E PROTEINASI come riportato in Sambrook and Maniatis, CSH 1988 (Blin and Stafford, Nucleic Acids Res., 1973, 3:2303), mentre l'estrazione di RNA da materiale fresco o congelato fu effettuata secondo il metodo di Chomczynski and Sacchi (Chomczynski P and Sacchi N. Anal Biochem., 1987, 162:156-159) del kit commerciale Rnazol.

Fu applicato anche il kit commerciale Omnizol che prevede l'estrazione simultanea di entrambi gli acidi nucleici unicamente da campioni (tessutali e non) freschi.

Le rese totali in acidi nucleici ottenute con il metodo dell'invenzione e con i due sistemi comparativi, sono sintetizzate nella tabelle seguenti dove, per frammento si intende un reperto di grandezza compresa tra 10-20 mg, per biopsia si intendono dimensioni comprese da 1 a 9 mg. In alcuni casi sono indicate anche le concentrazioni delle soluzioni di acidi nucleici ottenute che si intendono riferite ad un totale di 20 μ l di volume totale.



Tabella 5. Tabella delle rese di estrazione totali di acidi nucleici secondo il metodo dell'invenzione, secondo i kit commerciali OMNIZOL e RNAZOL, oppure secondo un protocollo dell'arte nota (protocollo Blin & Stafford) da campioni congelati.

ACIDO NUCLEICO ESTRATTO	PROTOCOLLO USATO	CAMPIONE BIOPTICO (1-9 mg)	FRAMMENTO CHIRURGICO o AUTOPTICO(10-20mg)
RNA	SIMULTANEUS	15.2 – 31.4 μ g	24.4 – 53.8 μ g
RNA	OMNIZOL	1.2 – 5.2 μ g	4.4 – 11.6 μ g
RNA	RNAZOL	0.2 – 3.0 μ g	2.0 – 6.6 μ g
DNA	SIMULTANEUS	1.8 – 3.8 μ g	5.8 – 13.4 μ g
DNA	OMNIZOL	0.8 – 2.2 μ g	0.1 – 0.32 μ g
DNA	Prot. BLIN E STAFF.	0.2 – 0.8 μ g	0.1 – 0.19 μ g

Con il metodo dell'invenzione la concentrazione di RNA delle soluzioni ottenute risultò essere compresa tra un minimo di 0,76 μ g/ μ l ed un massimo di 1,57 μ g/ μ l (tabella 5) per le biopsie congelate o fresche e tra 0,12 e 0,99 μ g/ μ l per le biopsie fissate (Tabella 6) in 20 μ l di

tampone totale. In tabella 5 sono riportati i valori medi corrispondenti alle quantità totali estratte.

Come si può vedere in tabella, le rese di RNA da biopsie congelate utilizzando protocolli diversi dal metodo dell'invenzione erano di gran lunga inferiore a quelle ottenute con il metodo dell'invenzione: da 0,01 a 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0,2-3 μg totali) di RNA con RNAzol e da 0,06 a 0,26 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1,2-5,2 μg totali) di RNA seguendo il kit di estrazione simultanea Omnizol.

Anche per i frammenti si confermava che la quantità di RNA estratto con RNAzol era di gran lunga inferiore rispetto a quella estratta con il metodo dell'invenzione essendo compresa tra 0,1 e 0,33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, (2-6.6 μg totali) così come quella estratta con il kit Omnizol, che risultava essere compresa tra 0,22 a 0,58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (4.4 -11.6 μg totali)

Per quanto riguarda invece l'estrazione di DNA fu possibile estrarre DNA con il metodo dell'invenzione da tutti i campioni biotici sia congelati che di archivio, con un "range" di concentrazione da 0,09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ per le biopsie congelate (Tabella 5) e da 0,01 a 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ per le biopsie fissate (Tabella 6). Con gli altri protocolli invece le rese risultavano comparativamente sempre inferiori a quelle ottenute con il metodo dell'invenzione. In particolare erano comprese in un intervallo di valori di 0,8-2,2 μg totali (da 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) di DNA per il protocollo di Blin e Stafford e di 0,2-0,8 (da 0,01 a 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) di DNA secondo il kit di estrazione simultanea Omnizol (Tabella 5).

Le rese ottenute da campioni fissati sono riportate in tabella 6. Esse furono valutate solo nel metodo dell'invenzione poichè i kit RNAzol ed

Omnizol non sono adattabili all'estrazione di acidi nucleici da tessuti di archivio fissati.

Tabella 6. Rese di estrazione di acidi nucleici da campioni fissati secondo il metodo dell'invenzione (SIMULTANEOUS).

ACIDO NUCLEICO ESTRATTO	CAMPIONE BIOPTICO (sezioni inferiori a 30 mm ²)	FRAMMENTO CHIRURGICO o AUTOPTICO (sezioni superiore a 30 mm ²)
RNA	µg 2,4-19,8	µg 8,8-26
DNA	µg 0,2-1,6	µg 1,6-8,2

Inoltre vennero valutate le rese medie di RNA e DNA estratti da tessuti di partenza diversi quali: miocardio, fegato, cute, polmone, stomaco e tiroide, freschi, o fissati. Fu valutata anche, per alcuni tessuti disponibili, la resa da sezioni paraffinate di origine autoptica.

Tabella 7. Tabella riassuntiva rese di estrazione di acidi nucleici da tessuti diversi.

Tessuto	Tipo di prelievo	Acido nucleico	Concentrazione (µg/µl)	A260/280
Miocardio	Biopsia (cong.)	RNA	1.054	1.86
		DNA	0.118	1.48
	Biopsia (fissata)	RNA	0.428	1.83
		DNA	0.032	1.54
	Frammenti (cong.)	RNA	1.795	1.91
		DNA	0.41	1.51
Fegato	Frammenti (fissati)	RNA	1.145	1.95
		DNA	0.13	1.45
	Frammenti autoptici	RNA	0.326	1.66
		DNA	0.052	1.46
	Biopsia (cong.)	RNA	1.13	1.88
		DNA	0.176	1.5
Cute	Frammenti (fissati)	RNA	0.595	1.62
		DNA	0.234	1.48
	Frammenti autoptici	RNA	0.516	1.82
		DNA	0.138	1.5
	Biopsia (cong.)	RNA	0.972	1.88
		DNA	0.114	1.48
Polmone	Biopsia (fissata)	RNA	0.83	1.84
		DNA	0.042	1.52
	Frammenti (fissati)	RNA	0.92	1.81
		DNA	0.128	1.5
	Biopsia (cong.)	RNA	0.992	1.84
		DNA	0.13	1.48
Stomaco	Biopsia (fissata)	RNA	0.65	1.84
		DNA	0.042	1.58
	Frammenti (cong.)	RNA	1.791	1.84
		DNA	0.446	1.55
	Frammenti autoptici	RNA	0.472	1.84
		DNA	0.076	1.46
Tiroide	Biopsia (fissata)	RNA	0.622	1.84
		DNA	0.03	1.56
	Frammenti (fissati)	RNA	0.815	1.81
		DNA	0.135	1.51
	Frammenti (cong.)	RNA	1.896	1.84
		DNA	0.404	1.54

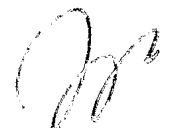
RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per isolare contemporaneamente e separatamente gli acidi ribonucleici e gli acidi deossiribonucleici da uno stesso campione biologico avente peso non inferiore a 0.5 mg, dove tale campione è fresco, congelato, fissato oppure è di provenienza autoptica, che comprende essenzialmente i seguenti passaggi:
 - a) lisi del campione mediante incubazione in una soluzione di lisi comprendente: un agente caotropico, un detergente ionico, un enzima proteolitico, un agente riducente,
 - b) deproteinizzazione mediante estrazione del campione con una fase organica costituita da una miscela comprendente alcool aromatici e dove tale fase organica viene conservata dopo estrazione della fase acquosa, e comprendente inoltre una opzionale ed ulteriore ri-estrazione della fase organica con una soluzione acquosa,
 - c) precipitazione degli acidi ribonucleici (RNA) mediante aggiunta di un agente precipitante alla fase acquosa e di un alcool alifatico a catena corta;
 - d) precipitazione degli acidi deossiribonucleici (DNA) dalla fase organica di cui al punto b) mediante aggiunta di un agente precipitante e di un alcool alifatico a catena corta.
2. Procedimento in accordo con la rivendicazione 1 dove la soluzione di lisi di cui al punto a) comprende:
 - un agente caotropico scelto tra: urea o sali di guanidina,
 - un detergente ionico scelto tra SDS ed SLS,



A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'Jr' or similar, located in the bottom right corner of the page.

- un enzima proteolitico scelto tra: proteinasi K, tripsina, chimotripsina, pepsina, pronase
 - un agente riducente scelto tra: β -mercaptoetanol e ditione.
3. Procedimento in accordo con la rivendicazione 1 che comprende inoltre l'aggiunta di un inibitore delle RNAsi alternativamente al punto a) b) o c) del procedimento.
 4. Procedimento in accordo con la rivendicazione 3 dove tale inibitore è il Vanadyl ribonucleoside complex.
 5. Procedimento in accordo con le rivendicazioni 1-4 che comprende l'aggiunta di un agente precipitante scelto tra tRNA e glicogeno sia: alternativamente al punto c) o al punto a) del procedimento ed inoltre al punto d) del procedimento.
 6. Procedimento in accordo con la rivendicazione 5 dove l'agente precipitante è glicogeno.
 7. Procedimento in accordo con la rivendicazione 6 dove il glicogeno è in concentrazione finale non inferiore a 10ng/ml.
 8. Procedimento in accordo con la rivendicazione 7 dove il glicogeno è in concentrazione finale non inferiore a 50ng/ml.
 9. Procedimento in accordo con le rivendicazioni 1-8 dove l'alcool alifatico a catena corta è isopropanolo o etanolo.
 10. Procedimento secondo la rivendicazione 2 dove i sali di guanidina nella soluzione di lisi di cui al punto a) sono scelti tra guanidina tiocianato o guanidina idrocloruro in concentrazione compresa tra 1 e 4 M.
 11. Procedimento secondo la rivendicazione 2 dove l'enzima proteolitico



nella soluzione di lisi di cui al punto a) è proteinasi K.

12. Procedimento in accordo con la rivendicazione 11 dove la concentrazione di proteinasi K è compresa tra 0.1 e 10 mg/ml e dove l'incubazione con tale enzima viene effettuata ad una temperatura superiore a 20°C.
13. Procedimento in accordo con le rivendicazioni 1 e 11-12 che comprende alla fine della fase a) del procedimento una ulteriore aggiunta di un enzima proteolitico ed una ulteriore incubazione.
14. Procedimento secondo la rivendicazione 1 dove la miscela di solventi organici ed alcol aromatici di cui al punto b) è fenolo oppure una miscela di fenolo-cloroformio a pH acido, preferibilmente compreso tra 5 e 6, ancor più preferibilmente 5,5.
15. Procedimento secondo la rivendicazione 14 dove il rapporto in volume tra fenolo e cloroformio nella miscela fenolo-cloroformio è compreso tra 3:1 e 7:1.
16. Procedimento in accordo con le rivendicazioni 1-15 dove la fase acquosa è ri-estratta con cloroformio dopo la prima estrazione con la miscela di alcool aromatici secondo il punto b) del procedimento.
17. Procedimento secondo le rivendicazioni 1-16 dove i sali in eccesso sono rimossi dal precipitato di RNA ottenuto al punto c) mediante lavaggio con una soluzione di un alcol a catena corta diluito con acqua bidistillata.
18. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 e 16-17 dove la soluzione acquosa di cui al punto b) e l'acqua bidistillata sono trattate con DEPC.



19. Procedimento secondo la rivendicazione 1 dove l'alcol alifatico aggiunto per precipitare il DNA in accordo con la fase d) del procedimento è isopropanolo e la precipitazione avviene incubando il campione a temperatura inferiore a 0°C.
20. Procedimento in accordo con la rivendicazione 19 dove il precipitato di DNA ottenuto viene lavato con una soluzione salina comprendente almeno il 5% di un solvente organico, e dove tale passaggio viene ripetuto opzionalmente per rimuovere le tracce di fenolo dal precipitato di DNA.
21. Procedimento secondo la rivendicazione 20 dove tale soluzione salina è scelta tra citrato o cloruro di sodio.
22. Procedimento secondo la rivendicazione 21 dove la soluzione è citrato di sodio in concentrazione compresa tra 10 e 200 mM ed avente pH compreso tra 6.8 e 7.3.
23. Procedimento secondo le rivendicazioni 1-22 dove il materiale biologico è costituito da cellule di una coltura cellulare, da un frammento biotico, da un frammento chirurgico, oppure da sezioni opzionalmente anche paraffinate.
24. Procedimento secondo la rivendicazione 23 dove le sezioni paraffinate sono previamente deparaffinate con un solvente organico.
25. Procedimento secondo la rivendicazione 24 dove tale solvente organico è scelto tra: xilolo e derivati del benzene.
26. Procedimento secondo la rivendicazione 23 per l'estrazione di acidi nucleici virali da tali materiali biologici.



27. Procedimento secondo la rivendicazione 23 dove tale acido nucleico virale è RNA.
28. Procedimento secondo le rivendicazioni 1-25 dove il campione ha un peso non superiore a 20 mg e dove il volume della soluzione di lisi aggiunto al campione in accordo con il punto a) del procedimento è compreso tra 100 e 800 μ l.
29. Kit per l'estrazione contemporanea e separata di RNA e DNA da campioni biologici freschi o fissati, opzionalmente anche paraffinati, in accordo con il procedimento secondo le rivendicazioni 1-28, comprendente un tubo con una soluzione di lisi, un tubo con un agente precipitante, un tubo con un inibitore delle endoribonucleasi etc. ed un foglietto illustrativo del metodo riportante il procedimento in accordo con le rivendicazioni 1-28 ed opzionalmente tubi sterili e trattati con inibitori delle ribonucleasi, lame monouso, allumina.
30. Kit per l'estrazione di acidi nucleici virali da campioni biologici freschi, fissati o autoptici, opzionalmente anche paraffinati in accordo con il procedimento secondo le rivendicazioni 1-28, comprendente uno o più tubi contenenti oligonucleotidi specifici per la rilevazione di uno o più agenti virali mediante PCR, un foglietto illustrativo del metodo riportante il procedimento in accordo con le rivendicazioni 1-28 ed opzionalmente tubi contenenti i reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA.

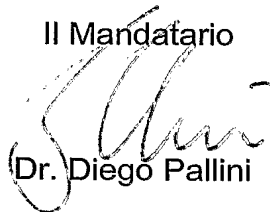
(SM/pd)



Milano, li 4 Febbraio 2004

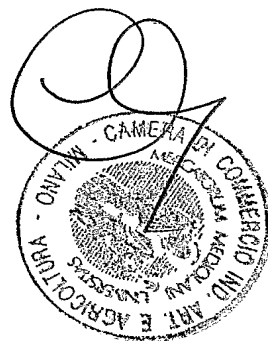
p. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Il Mandatario



Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



[Handwritten signature]

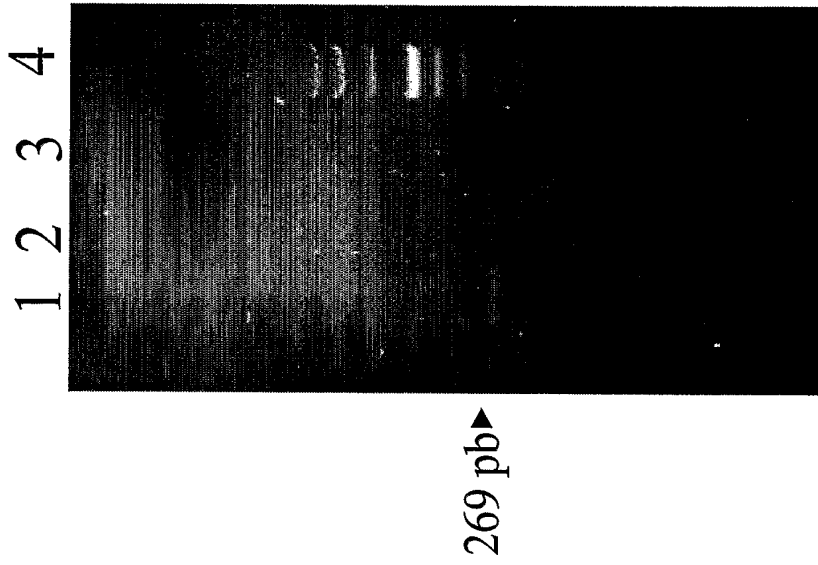


Fig. 2

MI 2004 A 0 00 16 7

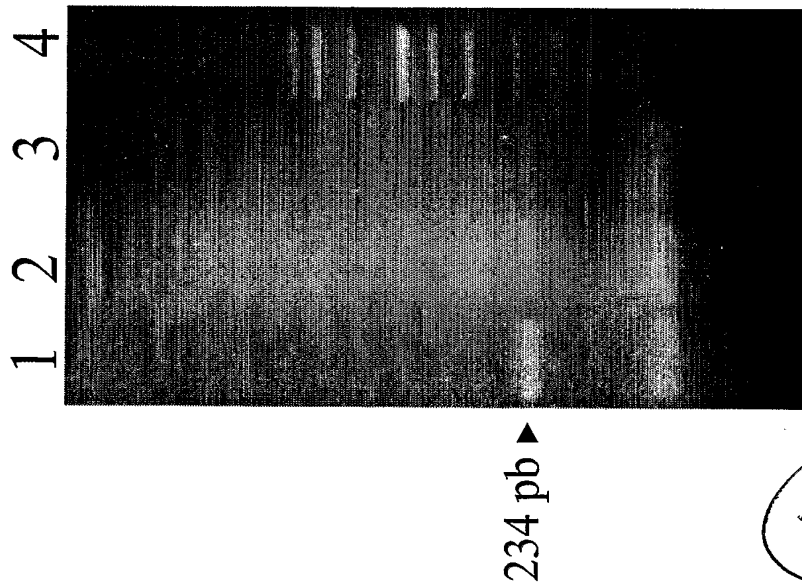
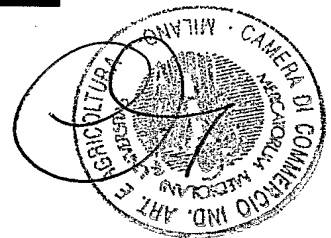


Fig. 1



[Handwritten signature]

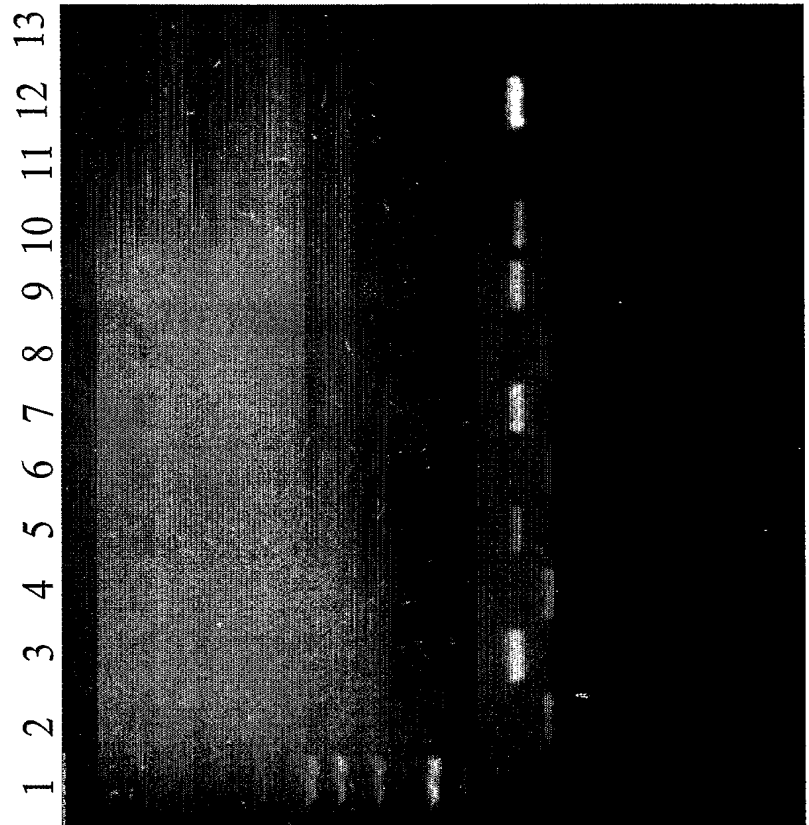
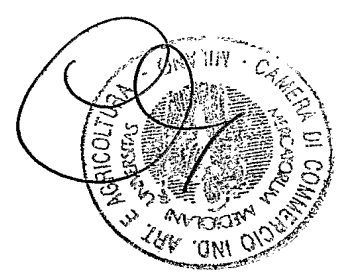


Fig.3

MI 2004 A0 00 16 7



[Handwritten signature]



1 2 3 4 5 6 7 8 9

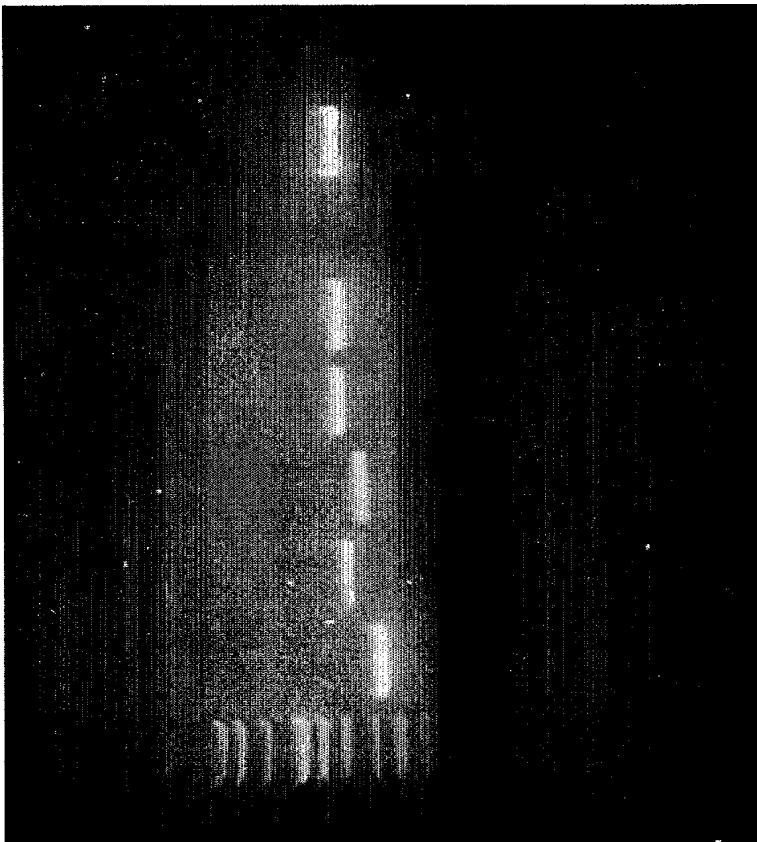
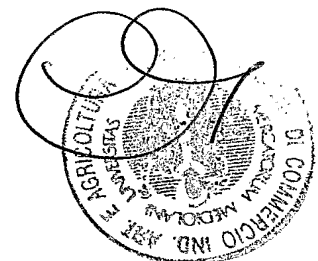


Fig. 4

MI 2004 A 0 00 16 Z



[Handwritten signature]

1 2 3 4 5 6 7 8

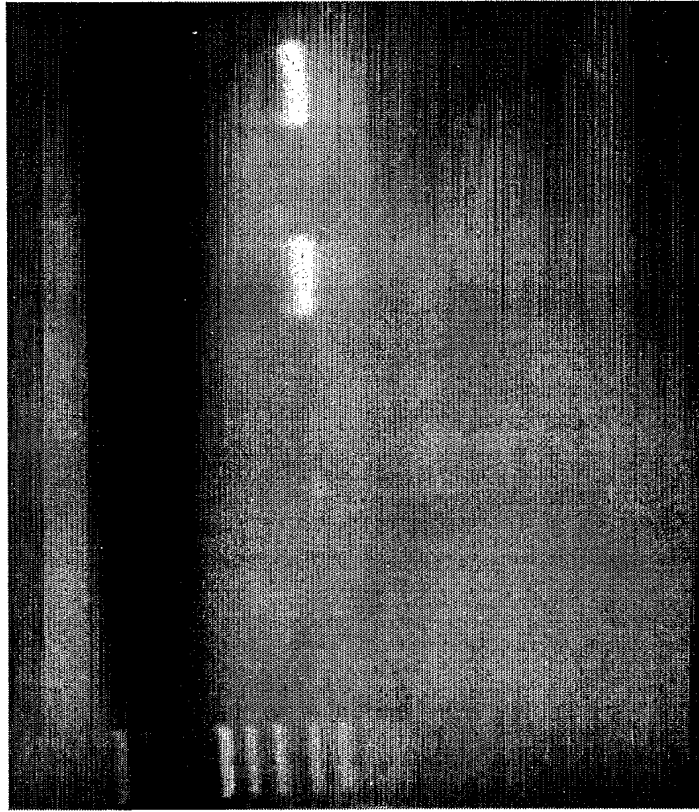


Fig 5

MI 2004 A0 00 16 7

